

## COMMUNICATIONS

---

### **Sérodiagnostic de l'anémie infectieuse des équidés par précipitation en gélose.**

#### **I. Mise au point de la technique**

par B. TOMA, G.-E. LUKA ISKANDER et P. GORET (\*) (\*\*)

Avec la collaboration technique de M<sup>lle</sup> Annie FIOUX.

---

Pendant longtemps, le diagnostic expérimental de l'anémie infectieuse des équidés (A. I. E.) est demeuré difficile. En dehors des techniques non spécifiques et en l'absence d'animal de laboratoire sensible, seules se trouvaient disponibles l'inoculation au cheval, méthode onéreuse fournissant des résultats parfois très tardifs, et les réactions sérologiques. Parmi ces dernières, pour le diagnostic de routine, la réaction de fixation du complément n'est guère utilisable en raison du caractère fugace des sensibilisatrices et la réaction de neutralisation du virus en culture cellulaire n'est pas pratique.

Récemment, COGGINS et NORCROSS (1) ont publié une technique de diagnostic de l'A. I. E. par précipitation en gélose avec un antigène constitué par de la pulpe splénique. Nous avons étudié cette technique et apporté quelques modifications, notamment la préparation d'un *antigène liquide* qui permet un titrage des réactifs et par suite autorise une meilleure codification des conditions de la réaction.

#### **I. — RÉACTIFS**

##### **A. — Antigène de référence.**

L'obtention d'un bon antigène est assez délicate. Il est préparé à partir de la rate de poneys ou de chevaux inoculés avec une forte

---

(\*) Nous tenons à exprimer nos vifs remerciements à notre collègue le Docteur COGGINS de l'Université de Cornell pour les informations qu'il a bien voulu nous communiquer et la collaboration qu'il nous a accordée.

(\*\*) Travail subventionné par la Société d'Encouragement, 11 rue du Cirque, Paris 8<sup>e</sup> (Directeur J. ROMANET) et par l'I. N. R. A.

dose d'une souche très virulente de virus de l'anémie infectieuse (souche Wyoming). Un bon antigène n'est obtenu que lorsque l'animal présente une réaction fébrile sévère (40 °C) après une courte incubation, de l'ordre de 3 à 5 jours. La rate est prélevée entre le 9<sup>e</sup> et le 11<sup>e</sup> jour après l'inoculation. Il est souhaitable d'injecter 10 ml d'une solution d'adrénaline au millième, quelques minutes avant l'abattage, afin d'entraîner une contraction splénique destinée à chasser le sang de la rate pour éviter une « dilution » de l'antigène (2).

Six chevaux et poneys ont déjà été utilisés en vue d'obtenir une quantité suffisante d'antigène pour réaliser une enquête épidémiologique appliquée à un grand nombre de chevaux français et étrangers.

Les courbes représentant les températures relevées pour quatre d'entre eux, à la suite de l'inoculation, sont rassemblées sur la figure n° 1. L'étude du pouvoir précipitant des extraits préparés à partir de la rate de ces quatre animaux fait ressortir un parallélisme entre l'intensité et la précocité de la réaction thermique et la valeur de l'antigène. En effet, les 4 antigènes peuvent être classés par ordre de valeur décroissante de la manière suivante : poney II, poney I, Naudary, Edelweiss, ordre que l'on retrouve pour la réaction thermique (cf. fig. n° 1).

La rate est ensuite conservée à — 30 °C ; elle fournit de meilleurs résultats après conservation pendant quelques semaines à cette basse température.

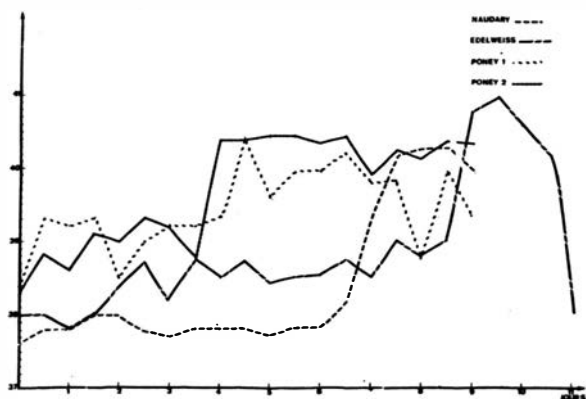


FIG. n° 1. — Evolution de la température chez quatre équidés ayant servi à la préparation de l'antigène. La qualité des antigènes obtenus est liée à la précocité et à l'intensité de la réaction thermique. Par ordre décroissant de valeur les antigènes peuvent être classés : poney II, poney I, Naudary et Edelweiss.

Deux extraits préparés à partir de la même rate à quelques mois d'intervalle peuvent fournir des antigènes de valeur très différente. Parfois un extrait préparé dans les jours qui suivent le sacrifice du cheval se révèle dépourvu de pouvoir précipitant dans les conditions habituelles de réalisation du test alors qu'un autre extrait préparé selon les mêmes modalités mais après plusieurs mois de conservation à  $-30^{\circ}\text{C}$  fournit un précipité satisfaisant.

La préparation de l'antigène comprend des cycles de congélation et de décongélation effectués sur des petits fragments de rate. Le flacon contenant la pulpe splénique est placé alternativement pendant 20 minutes dans un mélange de neige carbonique et d'alcool puis pendant 30 minutes au bain-marie à  $37^{\circ}$ . Une dizaine de cycles suffisent pour la préparation d'un antigène satisfaisant. Cependant, nous avons constaté au cours de la comparaison d'extraits provenant de la même rate et soumis à 10, 20, 30 ou 40 cycles de congélation et de décongélation que le pouvoir précipitant de l'antigène augmentait avec le nombre de cycles de congélation.

La pulpe splénique congelée et décongelée est ensuite broyée (\*) pendant 5 minutes, en présence de glace, puis centrifugée pendant 20 minutes à 27.000 G.

L'antigène est constitué par le surnageant. Nous préférons en effet cet antigène à la pulpe splénique elle-même car il est possible, grâce à des dilutions, d'introduire une appréciation quantitative de la valeur de l'antigène.

Il est nécessaire de titrer le surnageant en présence du sérum de référence afin d'établir, par la technique de l'échiquier, la concentration à utiliser pour déceler facilement la plus faible quantité d'anticorps (cf. tableau n° I).

Sur ce tableau on constate l'existence de résultats correspondant au phénomène de zone, par excès d'anticorps ou d'antigène, fait classique pour la précipitation avec les sérums de chevaux et les antigènes de nature protéique.

Ainsi, le sérum dilué au 1/10 ne fournit pas de précipité en présence de l'antigène pur, à cause de l'excès d'antigène, tandis qu'il en fournit avec le même antigène dilué au 1/2 ou au 1/3. De même, le sérum pur ou dilué au 1/2 ne provoque pas la formation de précipité en présence de l'antigène dilué au tiers à cause d'un excès d'anticorps cette fois, alors qu'après dilution du sérum au 1/8 ou au 1/10 un précipité net apparaît. En fonction des résultats obtenus avec l'antigène provenant de ce cheval, nous avons retenu la dilu-

---

(\*) Ultraturrax (Labo Moderne, 37, rue Dombasle, Paris 15<sup>e</sup>).

TABLEAU n° 1

Résultats du titrage de l'antigène avec le sérum positif de référence.  
L'intensité des lignes de précipité est appréciée en nombre de croix.  
Ultérieurement, l'antigène est utilisé après dilution au demi et le sérum  
après dilution au 1/5<sup>e</sup>

Dilutions du sérum  Dilu- tions de l'an- tigène	Pur	1/2	1/3	1/4	1/5	1/6	1/8	1/10	1/12	1/15	1/20	1/30
Pur	+++	+++	++++	++++	++++	+++	++	—	—	—	—	—
1/2	—	+	++	+++	++++	+++	+++	++	++	+	—	—
1/3	—	—	+	+	++	++	+++	+++	++	++	+	—
1/4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

tion la plus forte de l'antigène qui permette d'obtenir encore un précipité net, soit la dilution de l'antigène au demi dans ce cas. Cette dilution autorise un dépistage de sérums contenant une plus faible quantité d'anticorps que ne le permettrait l'emploi de l'antigène pur (cf. tableau n° I).

D'autres tissus prélevés sur les chevaux sacrifiés au 9<sup>e</sup> jour, à savoir le foie, les reins, les poumons et les ganglions mésentériques ainsi que leur sérum ne nous ont pas permis d'obtenir de précipité en présence de sérums contenant des anticorps anti-anémie infectieuse.

Le pouvoir précipitant de l'antigène liquide résiste au traitement par l'éther, le chloroforme et la trypsine. Il est diminué après action de la papaïne et disparaît lors de chauffage à 50° pendant 20 minutes ou davantage.

#### B. — Anticorps.

1. — *Sérum sous expertise.* Il provient du sang de l'animal suspect.

2. — *Sérum de référence.* Le sérum de référence est obtenu par saignée d'un cheval en état d'infection inapparente ou atteint d'une forme chronique et ayant reçu plusieurs inoculations de virus de l'anémie infectieuse. Il faut choisir un sérum fournissant une ligne de précipité mince et dense et l'utiliser à la dilution déterminée après titrage.

## II. — RÉACTION, LECTURE, INTERPRÉTATION.

A. — *Réaction.*

La gélose est coulée dans des boîtes de Pétri en matière plastique de 85 mm de diamètre.

On dépose dans la boîte une première quantité de 5 ml de gélose (\*) à 2 p. 100 dans un tampon borate de formule :

NaOH .....	2 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> .....	9 g
Eau distillée .....	1 l
pH 8,6	

Après prise en masse, on ajoute 18 ml de la même gélose mais à une concentration de 1 p. 100.

Les boîtes de gélose doivent être préparées le jour même de leur emploi.

A l'aide d'un emporte-pièce métallique spécial comportant 7 tubes, on découpe la partie supérieure de la gélose (à 1 p. 100) sans toucher la couche inférieure.

Les petits cylindres de gélose découpée sont ensuite retirés et l'on obtient 7 puits d'un diamètre de 7 mm distants les uns des autres de 3 mm.

L'antigène est alors déposé dans le puits central avec une micropipette (\*\*).

Le sérum de référence est placé dans deux puits opposés et les 4 autres cupules sont remplies à l'aide des sérums suspects. De cette manière chaque sérum peut être comparé directement avec le sérum de référence voisin (cf. fig. n° 2).

Les boîtes de Pétri sont laissées à la température du laboratoire en atmosphère humide. La température du laboratoire nous a permis d'obtenir de meilleurs résultats que + 4 °C ou 37 °C.

B. — *Lecture.*

Les boîtes sont observées sur fond noir et sous un éclairage oblique intense. Les lignes de précipitation du sérum de référence sont déjà visibles 12 h après le dépôt des réactifs. On effectue une première lecture à la 24<sup>e</sup> h et une seconde lecture à la 48<sup>e</sup> h. Il est

(\*) Special agar Noble Difco (O. S. I. 141, rue de Javel, Paris 15<sup>e</sup>).

(\*\*) Micropipette Eppendorf.



FIG. n° 2. — Disposition des sérums et de l'antigène dans les cupules :

cupule n° 1 : antigène,  
cupules n°s 2 et 5 : sérum positif de référence.  
cupules n°s 3, 4, 6 et 7 : sérums négatifs.

Remarquer l'aspect régulier et symétrique des deux lignes de précipité fournies par le sérum positif de référence. Comparer avec l'aspect de la figure n° 4.

inutile de poursuivre la lecture au-delà, car l'aspect ne se modifie guère.

Les lignes de précipité minces et bien marquées sont facilement observées d'autant qu'elles rejoignent la ligne de précipité fournie par le sérum de référence voisin (cf. fig. n° 3).

Les sérums de certains chevaux atteints d'anémie infectieuse depuis longtemps peuvent *ne pas provoquer l'apparition de précipité à cause d'un excès d'anticorps*. De tels sérums sont cependant repérables car ils inhibent la partie la plus proche de la ligne de précipité du sérum de référence voisin (cf. fig. n° 4). Après dilution au 1/4 et au 1/8 ces sérums donnent naissance au précipité spécifique.

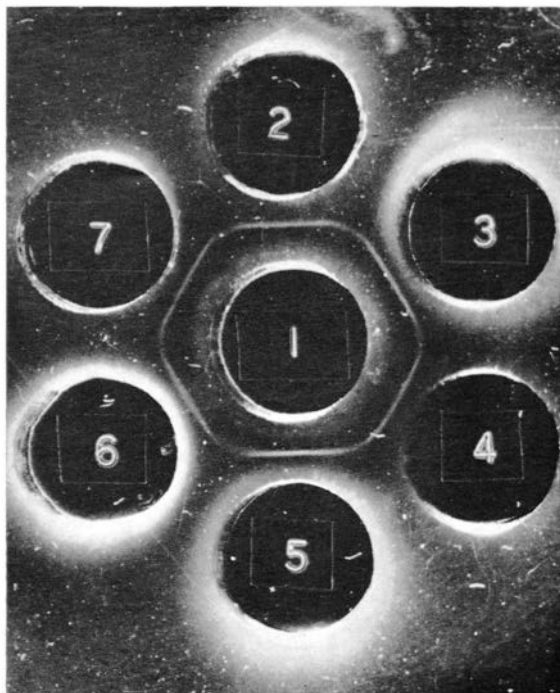


FIG. n° 3. — Convergence des lignes de précipité formées par le sérum positif de référence (cupules 2 et 5) et les sérums placés dans les cupules n°s 3, 4, 6 et 7 (cupule n° 1 : antigène).

Les sérums contenant de faibles quantités d'anticorps entraînent une *dévi*ation de la ligne du précipité du sérum de référence voisin devant la cupule dans laquelle ils sont déposés (cf. fig. n° 5). Au contraire la ligne de précipité du sérum de référence se dirige directement jusqu'aux cupules dans lesquelles sont placés des sérums dépourvus d'anticorps (cf. fig. n° 5).

#### C. — *Interprétation.*

La constatation d'une ligne de précipité présentant une réaction d'identité avec le précipité voisin du sérum de référence suffit pour établir le diagnostic sérologique. Il est nécessaire de différencier les lignes spécifiques de bandes non spécifiques de l'A. I. E. parfois rencontrées et qui coupent le précipité voisin de référence (cf. fig. n° 5).

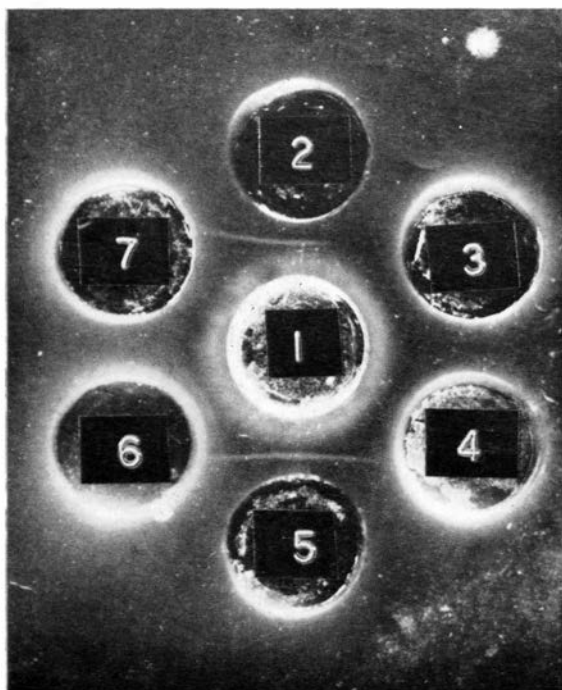


FIG. n° 4. — Inhibition du précipité fourni par le sérum positif de référence dans la zone de diffusion d'un sérum contenant un excès d'anticorps par rapport à l'antigène employé :

cupule n° 1 : antigène,  
 cupules n° 2 et 5 : sérum positif de référence,  
 cupule n° 3 : sérum contenant un excès d'anticorps,  
 cupules n° 4, 6 et 7 : sérums dépourvus d'anticorps.

Remarquer l'asymétrie de la ligne de précipité formée par le sérum positif de référence placé dans la cupule n° 2 alors que le même sérum placé dans la cupule n° 5 fournit une ligne de précipité symétrique.

La preuve de la spécificité de la réaction antigène liquide-sérum de référence peut être apportée par différentes techniques. Ainsi il est possible de supprimer le pouvoir précipitant du sérum en le mettant en contact avec l'extrait liquide provenant de la rate de cheval atteint d'anémie infectieuse alors que des extraits de rates normales ne modifient pas le pouvoir précipitant du sérum. De la même façon, le pouvoir précipitant de l'antigène est supprimé



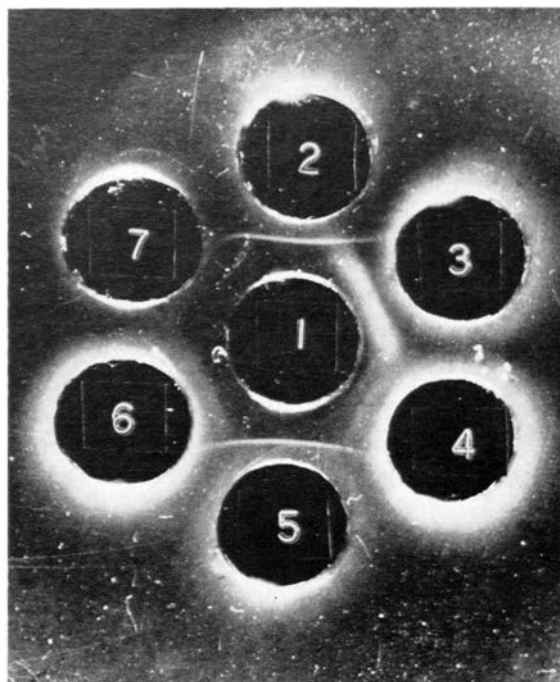


FIG. N° 5. — Inflexion de la ligne de précipité du sérum positif de référence devant la cupule contenant un sérum faiblement positif. Remarquer par ailleurs la zone de précipité non spécifique A. I. E. présente devant la cupule n° 3 (absence de réaction d'identité avec la ligne de précipité spécifique A. I. E.) :

cupule n° 1 : antigène,  
 cupules n°s 2 et 5 : sérum positif de référence,  
 cupules n°s 3, 4 et 6 : sérums négatifs,  
 cupule n° 7 : sérum possédant une faible quantité d'anticorps  
 A. I. E.

après contact avec le sérum anti-anémie infectieuse et non pas avec des sérums de chevaux normaux. Par ailleurs, le pouvoir précipitant apparaît dans le sérum de chevaux recevant des quantités aussi faibles que 0,1 ml de matériel contenant le virus de l'anémie infectieuse. Enfin, l'étude comparée de divers systèmes antigène-anticorps comprenant notamment *Streptococcus equi* et le virus de l'artérite à virus ne révèle pas de communauté antigénique avec le virus de l'anémie infectieuse.

La spécificité de cette réaction nous apparaît donc totale à l'heure actuelle.

Il nous est arrivé cependant parfois de ne pas pouvoir répondre « positif » ou « négatif » pour un sérum. Dans de très rares cas, nous avons utilisé la mention « douteux ». Nous avons appliqué ce terme à des sérums ne fournissant pas avec certitude un résultat positif et pour lesquels on pouvait déceler une très légère inflexion de la ligne de précipité témoin voisin. La répétition du test une quinzaine de jours après entraîne en général une réponse cette fois nettement positive.

Les anticorps précipitants apparaissent en moyenne 20 à 30 jours après l'inoculation expérimentale de virus. Au plus tard 8 à 10 jours après le premier accès de fièvre, les anticorps précipitants sont décelables. Aussi en cas de réponse négative avec le sérum d'un cheval malade depuis très peu de temps, il est nécessaire de procéder à un nouvel examen sur un prélèvement effectué 8 à 10 jours plus tard. Les anticorps précipitants persistent ensuite sans doute pendant toute la vie de l'animal.

### III. — VALEUR DU TEST DE PRÉCIPITATION POUR LE DIAGNOSTIC DE L'ANÉMIE INFECTIEUSE.

#### A. — *Avantages.*

La technique est sensible, spécifique, facile à mettre en œuvre et fournit rapidement les résultats (24 à 48 h après réception du prélèvement).

Elle est la seule actuellement disponible pour le diagnostic courant ou le dépistage sérologique de la maladie.

La réponse est positive même pour des chevaux infectés mais *apparemment sains* depuis plusieurs mois ou plusieurs années (infection latente de 5 ans pour un cheval) (3).

#### B. — *Inconvénients.*

La préparation de l'antigène est délicate et onéreuse.

La positivité de la réaction n'apparaît qu'assez tardivement : pendant les trois premières semaines qui suivent la contamination, il n'est pas possible de déceler d'anticorps précipitants. L'absence de précipité lors d'examen du sérum d'un cheval malade depuis peu de temps doit donc entraîner l'étude d'un autre échantillon de sérum prélevé 8 à 10 jours plus tard.

La lecture des résultats nécessite un certain entraînement pour éviter une confusion avec des lignes non spécifiques de l'A. I. E. parfois rencontrées.

Les premières réactions effectuées dans un laboratoire doivent être comparées avec les résultats fournis par les mêmes sérums envoyés à un laboratoire de référence.

### CONCLUSION

La technique de précipitation en gélose avec un antigène liquide d'origine splénique est simple, pratique et spécifique. La nature liquide de l'antigène permet de réaliser un titrage et par suite de rendre la réaction plus sensible grâce à la détermination de la dose optimale d'antigène permettant de déceler la plus faible quantité d'anticorps capable de donner naissance à un précipité visible.

La réaction de précipitation en gélose constitue un progrès considérable pour le diagnostic et le dépistage sur une grande échelle de l'anémie infectieuse des équidés. Elle autorise la réalisation d'une enquête épidémiologique, dont nous donnons ci-après les premiers résultats, et permet la mise en œuvre d'une prophylaxie rationnelle.

*Laboratoire de la chaire de Maladies  
Contagieuses, Zoonoses et Législa-  
tion sanitaire, Station I. N. R. A.,  
Ecole Vétérinaire d'Alfort-94.  
(Pr. P. GORET).*

### BIBLIOGRAPHIE

1. COGGINS (L.) et NORCROSS (N. L.). — Immunodiffusion reaction in equine infectious anemia. *Corn. Vet.* 1970, **60**, 330-335.
2. COGGINS (L.). — Communication personnelle.
3. GORET (P.), TOMA (B.) et LUKA ISKANDER (G. E.). — Le diagnostic expérimental de l'anémie infectieuse des équidés. Intérêt de la technique d'immunodiffusion en gélose de COGGINS. *Communication au 19<sup>e</sup> congrès Mondial Vétérinaire, Mexico, août 1971.*
4. KONO (Y.), KOBAYASHI (R.) et FUKUNAGA (Y.). — Serological comparison among various strains of equine infectious anemia virus. *Archiv. f. gesamte virusf.* 1971, **34**, 202-208.
5. NAKAJIMA (H.) et USHIMI (E.). — Immunodiffusion studies of purified Equine Infectious anemia virus. *Inf. Imm.* 1971, **3**, 373-377.
6. TOMA (B.), LUKA ISKANDER (G. E.) et GORET (P.). — Diagnostic de l'anémie infectieuse des équidés par la technique de précipitation en gélose : essais de standardisation de l'antigène et de la technique. *Communication au 12<sup>e</sup> Congrès International de Standardisation microbiologique, Annecy, 1971.*